

Terapia gênica com VEGF para angiogênese na angina refratária: ensaio clínico fase I/II

VEGF gene therapy for angiogenesis in refractory angina: Phase I/II clinical trial

Renato A. K. KALIL¹, Felipe Borsu de SALLES², Imarilde Inês GIUSTI³, Clarissa Garcia RODRIGUES⁴, Sang Won HAN⁵, Roberto Tofani SANT'ANNA⁶, Eduardo LUDWIG⁷, Gabriel GROSSMAN⁸, Paulo Roberto Lunardi PRATES⁹, João Ricardo Michelin SANT'ANNA¹⁰, Guaracy Fernandes TEIXEIRA FILHO¹¹, Nance Beyer NARDI¹², Ivo Abrahão NESRALLA¹³

RBCCV 44205-1192

Resumo

Objetivo: Avaliar a segurança, viabilidade e efeitos iniciais, clínicos e sobre a perfusão miocárdica, da administração intramiocárdica, transtorácica, de VEGF 165 plasmidial em pacientes com doença arterial coronariana avançada e angina refratária, não passíveis de revascularização percutânea e cirúrgica.

Métodos: Ensaio clínico fase I/II. Treze pacientes cardiopatas isquêmicos com angina refratária apesar de tratamento medicamentoso máximo por no mínimo seis meses, não passíveis de revascularização cirúrgica ou por cateter foram submetidos a injeções intramiocárdicas de

2000µg VEGF 165 plasmidial. Os pacientes foram avaliados por cintilografia miocárdica, teste ergométrico, questionário de qualidade de vida (Minnesota) e determinação das classes de insuficiência cardíaca (NYHA) e angina (CCS).

Resultados: Não houve óbitos ou reintervenções. Durante o período de tratamento medicamentoso máximo, não se observou diferenças em cintilografias miocárdicas, testes ergométricos e questionários de qualidade de vida, ainda, houve tendência a piora das classes NYHA ($P=0,05$) e CCS ($P=0,05$). Três meses após intervenção, observou-se melhora dos escores cintilográficos SSS ($18,38\pm 7,51$ vs. $15,31\pm 7,29$, $P=0,003$) e SRS ($11,92\pm 7,49$ vs. $8,53\pm 6,68$, $P=0,002$), porém

1. Doutor, Diretor Científico do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/Fundação Universitária de Cardiologia. Bolsista de produtividade CNPq.
2. Acadêmico de medicina da UFCSPA, Bolsista de Iniciação Científica no Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia.
3. Especialista, Médica Cardiologista do Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia.
4. Enfermeira Residente do Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia.
5. Químico - Pós-doutorado em terapia gênica, Diretor do Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica da Universidade Federal de São Paulo.
6. Médico Residente em Cardiologia do Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia.
7. Especialista, Médico cardiologista, Chefe do serviço de Cardiologia Nuclear do Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia.
8. Doutor, Médico cardiologista do serviço de Cardionuclear do Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia.
9. Especialista, Cirurgião Cardiovascular do Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia.
10. Doutor, Cirurgião Cardiovascular do Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia.

11. Especialista, Cirurgião Cardiovascular do Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia.
12. Bióloga, Doutora em Imunologia. Coordenadora do Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular do Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia. Bolsista de Produtividade do CNPq.
13. Livre Docente, Cirurgião Cardiovascular, Diretor-Presidente do Instituto de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia.

Trabalho realizado no Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/Fundação Universitária de Cardiologia (IC/FUC) e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

Endereço para correspondência:

Renato A. K. Kalil - Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/FUC Avenida Princesa Isabel, 370 - Bairro Santana - Porto Alegre, RS, Brasil. CEP: 90620-000

E-mail: kalil.pesquisa@cardiologia.org.br

Artigo recebido em 11 de fevereiro de 2010

Artigo aprovado em 28 de junho de 2010

não na proporção da extensão da área de miocárdio isquêmico ($23,38 \pm 13,12\%$ vs. $20,08 \pm 13,88\%$, $P=0,1$). Houve tendência a melhora dos METs nas ergometrias ($7,66 \pm 4,47$ vs. $10,29 \pm 4,36$, $P=0,08$), melhora do escore de qualidade de vida ($48,23 \pm 18,35$ vs. $30,15 \pm 20,13$; $P=0,02$) e das classes NYHA ($3,15 \pm 0,38$ vs. $1,77 \pm 0,83$, $P=0,001$) e CCS ($3,08 \pm 0,64$ vs. $1,77 \pm 0,83$, $P=0,001$), no mesmo período.

Conclusões: A terapia demonstrou-se segura e viável nesta série de pacientes. Os resultados iniciais tendem a demonstrar melhora na gravidade da angina e redução da intensidade da isquemia miocárdica.

Descritores: Terapia de genes. Agentes indutores da angiogênese. Isquemia miocárdica. Angina pectoris.

Abstract

Objective: Safety, feasibility and early myocardial angiogenic effects evaluation of transthoracic intramyocardial phVEGF165 administration for refractory angina in no option patients.

Methods: Cohort study, in which 13 patients with refractory angina under optimized clinical treatment were included, after cineangiograms had been evaluated and found unfeasible by surgeon and interventional cardiologist. Intramyocardial injections of 5mL solution containing plasmidial VEGF165 were done over the ischemic area of

myocardium identified by previous SPECT/Sestamibi scan. Evaluations included a SPECT scan, stress test, Minnesota QOL questionnaire and NYHA functional class and CCS angina class determinations.

Results: There were no deaths or new interventions during the study period. There were no significant variations in SPECT scans, QOL scores and stress tests results during medical treatment in the included patients. After the 3rd post operative month, there was improvement in SPECT segmental scores, SSS ($18,38 \pm 7,51$ vs. $15,31 \pm 7,29$, $P=0,003$) and SRS ($11,92 \pm 7,49$ vs. $8,53 \pm 6,68$, $P=0,002$). The ischemic area extension, however, had non-significant variation ($23,38 \pm 13,12\%$ vs. $20,08 \pm 13,88\%$, $P=0,1$). Stress tests METs varied from $7,66 \pm 4,47$ pre to $10,29 \pm 4,36$ METs post-op ($P=0,08$). QOL score improved from $48,23 \pm 18,35$ pre to $30,15 \pm 20,13$ post-op points ($P=0,02$). NYHA class was $3,15 \pm 0,38$ pre vs. $1,77 \pm 0,83$ post-op ($P=0,001$) and angina CCS class, $3,08 \pm 0,64$ vs. $1,77 \pm 0,83$ ($P=0,001$).

Conclusions: Intramyocardial VEGF165 therapy for refractory angina, in this small trial of no option patients, resulted feasible and safe. Early clinical and scintigraphic data showed improvements in symptoms and myocardial perfusion, with regression of ischemia severity in treated areas.

Descriptors: Gene therapy. Angiogenesis inducing agents. Myocardial ischemia. Angina pectoris.

INTRODUÇÃO

A demonstração de que alguns fatores de crescimento vascular têm o potencial de induzir angiogênese no tecido isquêmico [1-3] tem estimulado a investigação de novas técnicas de tratamento para pacientes com doença arterial coronariana (DAC). Isso se deve à possibilidade de induzir angiogênese miocárdica e estabelecer circulação colateral, especialmente nos casos de angina refratária à terapêutica convencional e inviáveis para as técnicas de revascularização miocárdica tradicionais, percutânea e cirúrgica.

A complexa cascata de eventos que ocorre durante a neovascularização em resposta à isquemia envolve diversos fatores de crescimento e receptores [4]. O fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* - VEGF) tem sido foco de diversos estudos [5,6] e seus efeitos vem sendo testados em pacientes com DAC grave [7-20]. Estudos utilizam diferentes doses, vetores e vias de administração do VEGF. Ensaios clínicos trazem resultados controversos, muitos demonstrando

melhora clínica e evidência de angiogênese [8-19] e outros não apresentando diferenças na perfusão miocárdica quando comparados aos seus controles [7,20]. Dessa forma, apesar de promissores, permanecem não totalmente esclarecidos os efeitos clínicos e sobre a vascularização do miocárdio da terapia com VEGF em suas diversas formas e vias de administração, justificando-se novos estudos.

Este ensaio clínico tem como objetivo avaliar a segurança, a viabilidade e os efeitos iniciais (caracterizando um ensaio clínico fase I/II), clínicos e sob a perfusão do miocárdio, da administração intramiocárdica, transtorácica, de VEGF 165 plasmidial em pacientes com DAC avançada e angina refratária, não passíveis de revascularização percutânea e cirúrgica. Ressalta-se que foi utilizado, pela primeira vez, plasmídeo produzido inteiramente no Brasil.

MÉTODOS

Delineamento

Ensaio clínico fase I/II, o qual foi registrado no site *Clinical Trial.gov*, sob número NCT00744315. Nesse,

pacientes cardiopatas isquêmicos graves, não passíveis de revascularização cirúrgica ou por cateter, após análise da cinecoronariografia por hemodinamicista e por cirurgião cardiovascular independentemente, foram selecionados para período de otimização do tratamento clínico por período de 6 meses ou mais, antes de receber injeções intramiocárdicas de VEGF 165 via minitoracotomia esquerda. Todos os pacientes apresentavam angina refratária apesar de estarem sendo submetidos a tratamento medicamentoso máximo em ambulatório específico.

Amostra

Trze pacientes foram selecionados com angina refratária (Tabela 1), originados de 134 casos avaliados a partir dos seguintes critérios de elegibilidade: pacientes com angina refratária ao tratamento clínico otimizado ao máximo e cuja cinecoronariografia foi examinada por hemodinamicista e por cirurgião cardiovascular independentemente e julgados como intratáveis pelas técnicas percutânea ou cirúrgica, idade inferior a 75 anos, fração de ejeção ventricular esquerda superior a 25%, presença de sintomas de angina e/ou insuficiência cardíaca, apesar de tratamento medicamentoso máximo, ausência de neoplasia diagnosticada e manutenção de hipoperfusão miocárdica em cintilografia de controle após o período de tratamento farmacológico otimizado.

Vetor plasmidial

O vetor plasmidial utilizado foi desenvolvido no Brasil por um dos autores (S.W.H.) da Universidade Federal de

São Paulo e foi produzido comercialmente por empresa de tecnologia brasileira, a Excellion, de Petrópolis, RJ. A estrutura do PEX-HV5 é composta do íntron 1 e seu promotor com sinalizador do citomegalovírus (CMV). cDNA de VEGF165 humano foi inserido entre o promotor do CMV e a sequência poliA bovina. Este vetor também possui origem pUC e sequências de resistência à kanamicina para propagação em bactérias.

Intervenção

Os pacientes foram submetidos à intervenção em centro cirúrgico especializado em cirurgia cardiovascular, sob anestesia geral. O coração foi exposto por meio de incisão de aproximadamente 5 cm no 4º ou 5º espaço intercostal esquerdo, de acordo com a região do coração a ser tratada, realizando-se pericardiotomia ampla e reparo do pericárdio (Figura 1). A área a receber as injeções da solução do vetor plasmidial foi orientada pelo estudo da cintilografia miocárdica pré-operatória. Dez pontos do miocárdio isquêmico receberam, sob visão direta, um total de 2.000 mg de plasmídeo contendo gene VEGF 165, diluídos em total de cinco ml de solução salina. Para injeção, foi utilizada escalpe 25F. Antes da toracorráfia, foi colocado dreno pleural e mantido por 12h. A dor pós-operatória foi tratada com bloqueio intercostal e analgésicos injetáveis.

Fig. 1 - Janela pericárdica realizada para injeção intramiocárdica de VEGF 165



Tabela 1. Características da amostra.

Características	Pacientes (n=13)
Idade (anos)*	58,7±5,9
Gênero masculino †	12 (92,3%)
Fração de ejeção ventricular esquerda (%)*	56,0±14,5
Comorbidades	
Hipertensão arterial sistêmica †	12 (92,3%)
Diabetes mellito †	6 (46,2%)
Dislipidemia †	10 (76,9%)
Doenças Vasculares Prévias	
Infarto do miocárdio †	13 (100%)
Acidente vascular cerebral †	2 (15,4%)
Doença vascular periférica †	2 (15,4%)
Revascularizações Miocárdicas Prévias	
Cirúrgica †	11 (84,6%)
Percutânea †	12 (92,3%)

* Variáveis descritas em média e desvio padrão

† Variáveis descritas em frequências absolutas e relativas

Avaliações realizadas

Foram realizadas avaliações para seleção dos pacientes em ambulatório de cardiologia. Aqueles incluídos foram submetidos a avaliações no momento dessa inclusão, após mínimo de 6 meses de tratamento medicamentoso máximo, no período pré-operatório imediato, ao completar 1 e 3 meses de pós-operatório. Tais avaliações incluíram:

Cintilografia Tomográfica

A cintilografia miocárdica com cortes tomográficos (“*Single Photon Emission Computed Tomography*”-*SPECT*) sincronizada com o eletrocardiograma foi realizada com Tc-99m sestamibi e técnica de dois dias (repouso/estresse). Todos os pacientes foram submetidos a estresse farmacológico com dipiridamol na dose de 0,56 mg/kg em 4 minutos. A injeção do radiofármaco foi realizada no sétimo minuto do início da infusão do dipiridamol. As imagens foram adquiridas em gama-câmara de dois detectores, utilizando-se colimador de alta resolução e baixa energia, em órbita de 180° não-circular iniciando na projeção oblíqua anterior direita a 45° e finalizando na projeção oblíqua posterior esquerda, sendo obtidas 64 projeções com uma matriz de 64 X 64. As imagens foram reconstruídas utilizando retroprojeção filtrada convencional após redução de ruído com filtro passa-baixa (“*low-pass*”). Os estudos de estresse e repouso foram reconstruídos usando um filtro Butterworth, com frequência crítica de 0,5 Nyquist e ordem de 5.

O *software Emory Cardiac Toolbox* foi utilizado para localização dos limites do ventrículo esquerdo (verificado posteriormente por operador) e para a obtenção dos valores de fração de ejeção e volumes ventriculares. A extensão e gravidade da área isquêmica foram calculadas com emprego do *software Cedars-Sinai QPS*. Neste *software*, o ventrículo esquerdo é dividido em segmentos e cada um deles recebe uma pontuação de 0 a 4 (0 = perfusão normal a 4 = ausência de perfusão). São obtidos escores de gravidade: escore somado de estresse (SSS), escore somado de repouso (SRS) e escore diferencial (SDS). A extensão da área isquêmica é calculada comparando-se a perfusão do paciente com uma base de dados de pacientes normais. O resultado final do exame foi obtido por meio de consenso entre dois examinadores especialistas.

Teste Ergométrico

Foi utilizado protocolo de Naughton, o qual proporciona cerca de 1 MET por estágio. Este protocolo é indicado para indivíduos com limitações físicas importantes, especialmente idosos e sedentários, bem como evolução recente de infarto agudo do miocárdio e em portadores de insuficiência cardíaca compensada. O protocolo inicia com velocidade de esteira de 1,0 mph sem inclinação, com finalidade de aquecimento. A seguir, passa-se para 2,0 mph,

mantendo elevação zero. A partir deste estágio, a velocidade é fixa de 2 mph e a elevação da rampa sofre incrementos de 3,5%, a cada 3 minutos.

Escore de Qualidade de Vida pela aplicação do questionário de Minnesota (QOL) – versão brasileira

O questionário de qualidade de vida de Minnesota é composto por 21 questões relativas a limitações que frequentemente estão associadas com o quanto a insuficiência cardíaca (IC) impede os pacientes de viverem como gostariam. Considerando-se o último mês para responder aos questionamentos. A escala de respostas para cada questão varia de 0 (não) a 5 (demais), onde o 0 representa sem limitações e o 5, limitação máxima. Este questionário foi desenvolvido especificamente para IC, o que o torna mais próximo à realidade desse tipo de paciente.

Classe de insuficiência cardíaca (NYHA)

Conforme abaixo:

- Classe I – Sem limitações durante atividade corriqueira;
- Classe II – Alguma limitação decorrente de dispneia ou fadiga durante estresse ou exercício moderados;
- Classe III – Sintomas com os mínimos esforços que interferem com as atividades diárias;
- Classe IV – Inabilidade de realizar qualquer atividade física, dispneia em repouso.

Classe de angina (CCS)

Conforme abaixo:

- Classe I – Atividade física habitual, como caminhar ou subir escadas, não provoca angina. Angina ocorre com esforços físicos prolongados e intensos;
- Classe II – Discreta limitação para atividades habituais: a angina ocorre ao paciente caminhar ou subir escadas rapidamente, caminhar em aclives, caminhar ou subir escadas após refeições, ou no frio, ao vento, sob estresse emocional, ou apenas durante poucas horas após o despertar. A angina ocorre após caminhar por dois quarteirões planos ou subir mais de um lance de escada em condições normais;
- Classe III – Limitação com atividades habituais: a angina ocorre ao caminhar num quarteirão plano ou subir um lance de escada;
- Classe IV – Incapacidade de realizar qualquer atividade habitual sem desconforto, os sintomas anginosos podem estar presentes no repouso.

Considerações éticas

O estudo foi projetado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial, 1964) e foi aprovado pelos Comitês de Biossegurança e de Ética em Pesquisa (protocolo número

3849/06) locais, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), bem como pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), tanto quanto ao laboratório fornecedor do vetor plasmidial, como quanto ao bloco cirúrgico onde foram realizados os procedimentos. Todos os pacientes concordaram em participar do estudo de forma voluntária e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Análise estatística

As análises foram realizadas com a utilização do programa estatístico PAWS versão 18.0. Os dados

contínuos são expressos como média ± desvio padrão e as variáveis categóricas em frequências absolutas e relativas. Os grupos foram comparados pelo teste qui-quadrado (chi-square de Pearson) para variáveis categóricas e teste *t*-Student para variáveis contínuas. Quando houve três médias obtidas de amostras seguidas, a partir de variáveis contínuas com distribuição normal foi aplicada a análise de variância e correção de Bonferroni, e para os dados categóricos foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman, seguido de seu teste de comparações múltiplas. Foi considerado estatisticamente significativo um *P*<0,05.

Tabela 2. Variáveis trans e pós-operatórias.

	Pacientes (n=13)		
	Média±DP	Máximo	Mínimo
Transoperatório			
Tempo cirúrgico (min)	97,30±16,02	120	75
Pós-operatório			
Tempo de internação na UTI (horas)	29,70±10,87	47	17
Tempo de internação hospitalar (dias)	5,08±1,93	9	3
Tempo para extubação (horas)	3,58±3,36	11	0
Drenagem torácica (ml)	59,92±48,02	150	0

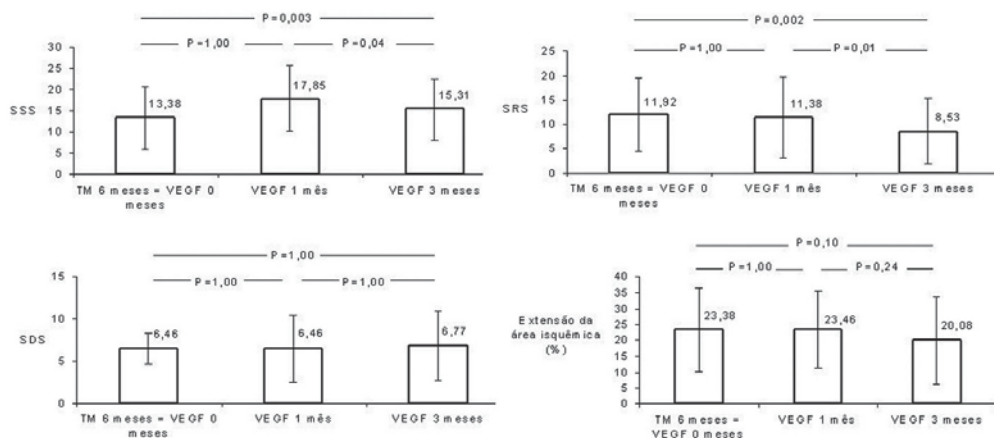


Fig. 2 - Cintilografia - média das extensões de área isquêmica e escores de isquemia segmentar ao estresse, repouso e diferencial apresentados pelos pacientes durante o período do estudo. TM 6 meses = VEGF 0 meses: tratamento medicamentoso no sexto mês = imediatamente antes da intervenção com VEGF 165; VEGF 1 mês: um mês após a intervenção de VEGF 165; VEGF 3 meses: três meses após a intervenção de VEGF 165. SSS=summed stress score, SRS=summed rest score, SDS=summed difference score. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste estatístico utilizado: Anova para amostras pareadas seguido de post hoc de Bonferroni

RESULTADOS

Segurança e viabilidade

As principais variáveis analisadas no período trans e pós-operatório, como tempos de internação, de cirurgia e drenagem torácica estão apresentadas na Tabela 2. Não houve casos de óbito ou reintervenção cirúrgica no período analisado. Houve um caso de internação pós-operatória prolongada devido à descompensação de *diabetes mellitus*. Ainda, um paciente apresentou extrassístoles ventriculares no pós-operatório imediato. Ressalta-se que o mesmo paciente já havia apresentado a mesma arritmia em teste ergométrico prévio, tendo havido reversão espontânea.

Outro paciente desenvolveu bacteremia associada à pneumonia em 12h de pós-operatório. Entretanto, as análises culturais do plasmídeo aplicado neste paciente não demonstraram crescimento fúngico ou bacteriano até ao quinto dia de observação em meio adequado. Este mesmo paciente necessitou de assistência em sala de emergência no 4º mês após a intervenção devido a crise de estresse ocasionada por doença familiar, sem ter sido constatada alteração na situação clínica cardiológica. O paciente foi manejado clinicamente, sem necessidade de internação

hospitalar. Outro paciente necessitou internação hospitalar por sinais de insuficiência cardíaca, sendo, também, manejado clinicamente.

Cintilografia miocárdica

As análises cintilográficas preliminares demonstraram redução do número de segmentos isquêmicos, nas fases de estresse e repouso. Embora a proporção total de área isquêmica do miocárdio ventricular após tratamento tenha apresentado tendência não significativa de redução, ou seja, era de $23,38 \pm 13,12\%$ do ventrículo esquerdo no pré-operatório imediato e após 3 meses era de $20,08 \pm 13,88\%$ ($P=0,1$), quando avaliados os escores segmentares de isquemia miocárdica, SSS (de $18,38 \pm 7,51$ para $15,31 \pm 7,29$, $P=0,003$) e SRS (de $11,92 \pm 7,49$ para $8,53 \pm 6,68$, $P=0,002$), observou-se redução significativa do número de segmentos isquêmicos aos três meses após terapia gênica com VEGF 165. O maior benefício foi observado depois de passado o primeiro mês de tratamento. O escore diferencial não apresentou variação significativa (Figura 2).

A Figura 3 ilustra a variação da perfusão miocárdica avaliada por cintilografia de um dos pacientes incluídos no protocolo. Observa-se melhora da perfusão da parede miocárdica inferior três meses após o tratamento.

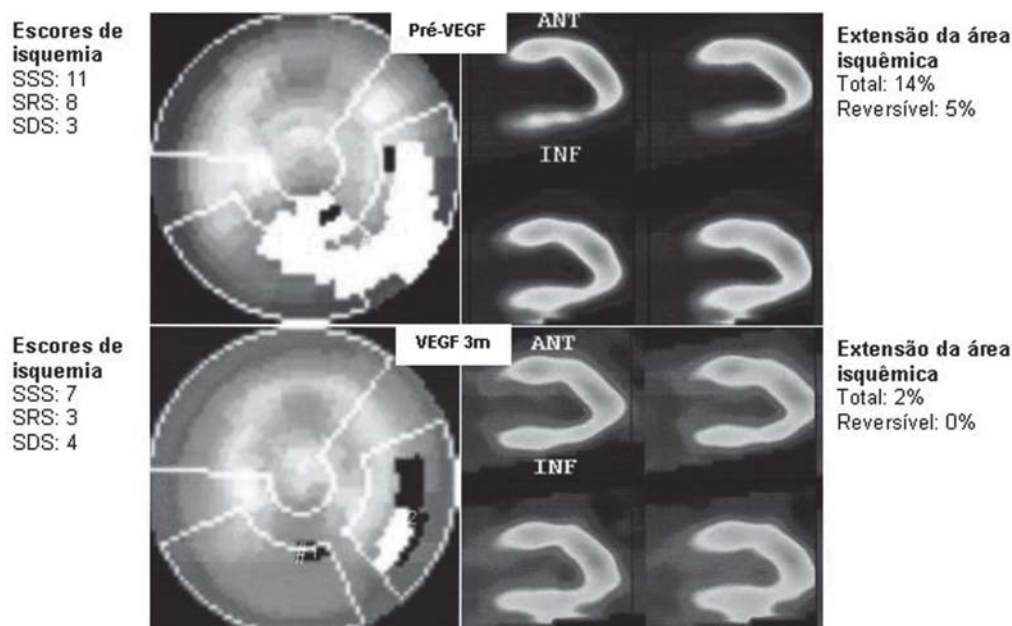


Fig. 3 - Imagem de cintilografia miocárdica de um dos casos estudados. Caso: 54 anos, sexo masculino, hipertenso, diabético, com história prévia de intervenções coronarianas percutâneas e cirurgia de revascularização do miocárdico. Recebeu $2000\mu\text{g}$ de VEGF 165 plasmidial em parede miocárdica inferior

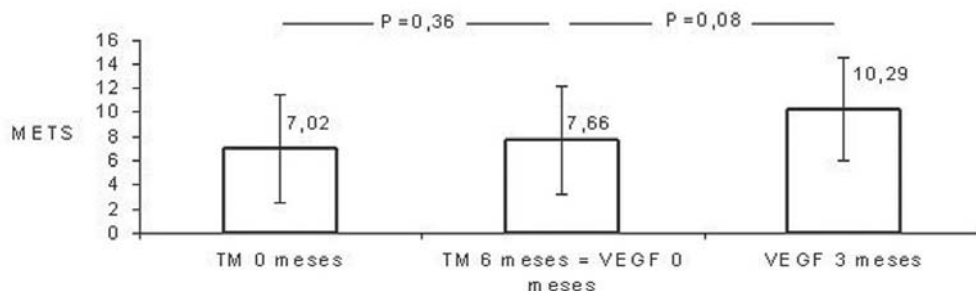


Fig. 4 - Teste ergométrico - Média dos METs obtidos pelos pacientes durante o período estudado. TM 0 meses: tratamento medicamentoso no início do estudo; TM 6 meses = VEGF 0 meses: tratamento medicamentoso no sexto mês = imediatamente antes da intervenção com VEGF 165; VEGF 3 meses: três meses após a intervenção de VEGF 165. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste estatístico utilizado: Anova para amostras pareadas seguido de post hoc de Bonferroni

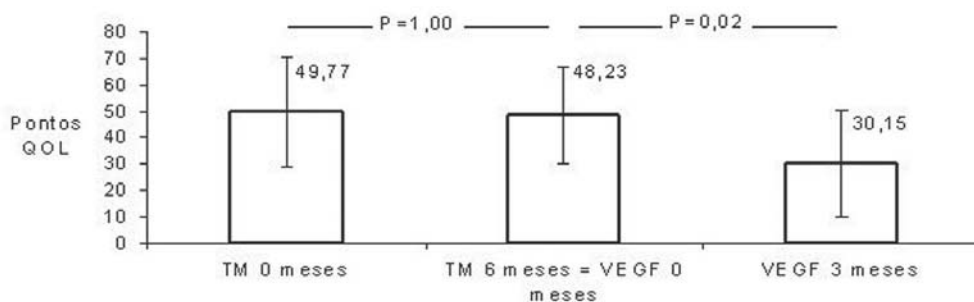


Fig. 5 - Média dos escores dos pacientes no questionário de qualidade de vida (Minnesota QOL) durante o período estudado. TM 0 meses: tratamento medicamentoso no início do estudo; TM 6 meses = VEGF 0 meses: tratamento medicamentoso no sexto mês = imediatamente antes da intervenção com VEGF 165; VEGF 3 meses: três meses após a intervenção de VEGF 165. Valores expressos em média e desvio padrão. Teste estatístico utilizado: Anova para amostras pareadas seguido de post hoc de Bonferroni

Teste ergométrico

Na avaliação realizada durante o período de tratamento clínico não foi demonstrada diferença nos METs obtidos nos testes ergométricos, que foram $7,02 \pm 4,54$ METs na inclusão versus $7,66 \pm 4,47$ METs no exame pré-operatório imediato ($P=0,36$). Todavia, foi demonstrada uma tendência, não significativa estatisticamente, ao aumento dos METs obtidos pelos pacientes três meses após a aplicação da terapia gênica, ou seja, de $7,66 \pm 4,47$ METs para $10,29 \pm 4,36$ METs ($P=0,08$) (Figura 4).

Qualidade de vida (Questionário de Minnesota)

Durante o período de tratamento medicamentoso

máximo, não houve diferença nos escores de qualidade de vida dos pacientes ($49,77 \pm 20,84$ na inclusão vs. $48,23 \pm 18,35$ no pré-operatório imediato; $P=1,00$). Após 3 meses da terapia gênica, foi demonstrada diminuição significativa do escore de pontos obtidos no questionário de qualidade de vida, ou seja, melhora dessa variável, de $48,23 \pm 18,35$ para $30,15 \pm 20,13$ pontos ($P=0,02$) (Figura 5).

Classes de Insuficiência Cardíaca (NYHA) e de Angina (CCS)

Foi demonstrada melhora significativa da mediana da classe de insuficiência cardíaca (NYHA) dos pacientes três meses após terapia gênica (mediana 3 e intervalo interquartil

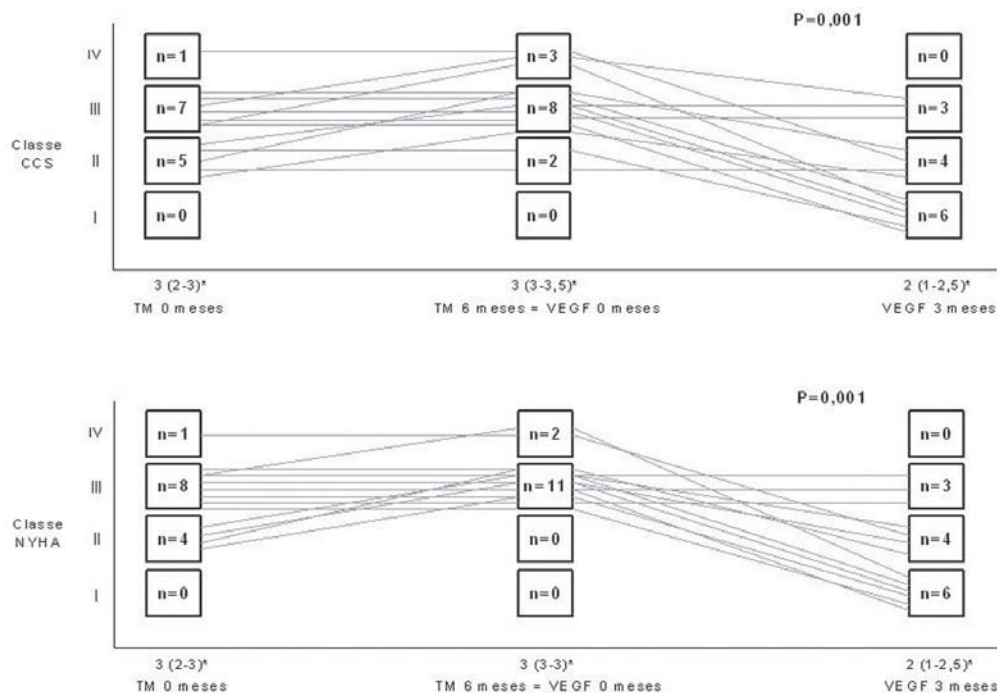


Fig. 6 - Variação das classes de insuficiência cardíaca (NYHA) e de angina (CCS) dos pacientes durante o período estudado. * Variável descrita em mediana e intervalo interquartil. TM 0 meses: tratamento medicamentoso no início do estudo; TM 6 meses = VEGF 0 meses: tratamento medicamentoso no sexto mês = imediatamente antes da intervenção com VEGF 165; VEGF 3 meses: três meses após a intervenção de VEGF 165. Teste estatístico utilizado: Friedman seguido de seu teste de comparações múltiplas

3-3 no pré-operatório para mediana 2 e intervalo interquartil 1-2,5 aos 3 meses, $P=0,001$), sendo que o mesmo não foi observado durante o tratamento medicamentoso máximo no período anterior, momento no qual as medianas e intervalos interquartil variaram de 3 (2-3) no início do tratamento medicamentoso a 3 (3-3) ao final do mesmo. Da mesma forma, não houve diferença na classe de angina dos pacientes durante o período de tratamento clínico (mediana 3 e intervalo interquartil 2-3 no basal para mediana 3 e intervalo interquartil 3-3,5 ao final do tratamento). Porém, quando a variável foi analisada três meses após terapia gênica, observou-se redução da mediana da classe de angina (mediana 3 e intervalo interquartil 3-3,5 no pré-operatório para mediana 2 e intervalo interquartil 1-2,5 aos 3 meses, $P=0,001$) (Figura 6).

Na avaliação clínica individual, observamos que nove pacientes apresentaram melhora da sintomatologia, enquanto quatro não relataram melhora. Não houve caso de piora do quadro clínico após terapia gênica. Ainda, durante o tratamento clínico, cinco pacientes referiram piora da sintomatologia e oito não relataram diferença da mesma.

DISCUSSÃO

A aplicação intramiocárdica de VEGF 165 plasmidial em pacientes com angina refratária por cardiopatia isquêmica sem outra alternativa terapêutica demonstrou-se viável e segura, nesta série. Outros autores já haviam relatado a segurança de procedimentos [19-21]. Entretanto, esta informação é importante por ter sido realizada em nosso meio e com peculiaridades técnicas no procedimento cirúrgico, sendo que, previamente, somente ensaios experimentais foram desenvolvidos no Brasil [23,24]. Além disso, foi empregado pela primeira vez em ensaio clínico um vetor plasmidial produzido inteiramente no Brasil. Sabe-se das extremas dificuldades em obter tais vetores para pesquisa clínica por meio de empresas e laboratórios internacionais.

Ocorreram complicações menores em apenas um paciente. Apesar de ter havido duas internações hospitalares no período de acompanhamento, foram necessárias somente condutas não invasivas para resolução dos quadros, como adequação do tratamento clínico.

Estudo prévio [17] demonstrou a segurança e a bioatividade da transferência de genes do VEGF em miocárdio isquêmico, através de vetor plasmidial humano (phVEGF165) por minitoracotomia em série de 20 pacientes com angina refratária comparada a terapia medicamentosa otimizada. Outro estudo [15], com o objetivo de avaliar a segurança e a eficácia do VEGF165 por via intramiocárdica, relatou o método como eficaz para tratamento em pacientes com DAC crônica e avançada, mesmo sendo um tratamento complementar ao medicamentoso. Ainda, um estudo randomizado fase II [7], duplo-cego, controlado por placebo, multicêntrico, testou phVEGF-A165 plasmidial via intramiocárdica percutânea direta em 80 pacientes com DAC grave, demonstrando segurança e tolerância à intervenção.

Ressalta-se que nosso estudo não fez uso de grupo controle paralelo. Optou-se pelo modelo de controle temporal, onde o paciente é seu próprio controle em período anterior ao de tratamento, devido à heterogeneidade e variabilidade da doença arterial coronariana, que torna inviável a adequada comparação entre os grupos, principalmente em séries pequenas. Todavia, todos os pacientes do estudo permaneceram por um período mínimo de seis meses em tratamento medicamentoso máximo antes da intervenção, que seria a opção para os pacientes que não fossem submetidos à mesma. Dessa forma, foi possível comparar os desfechos estudados durante a fase de tratamento medicamentoso máximo e após a terapia com VEGF 165, sendo cada paciente, como dito acima, controle de si mesmo. De qualquer forma, certamente não se descarta a possível interferência de efeito placebo nestes resultados.

Quando avaliadas as imagens cintilográficas, foi observada melhora dos escores de perfusão da área tratada aos três meses após injeção de VEGF 165 plasmidial, ao passo que nas cintilografias obtidas após um mês, esta melhora não foi evidenciada. Enquanto escores segmentares de isquemia em estresse e repouso, respectivamente SSS e SRS, que avaliam simultaneamente extensão e intensidade de isquemia miocárdica, demonstraram melhora de perfusão miocárdica, a extensão total de miocárdio com sinais cintilográficos de isquemia à observação individual não sofreu alteração no período.

O tratamento proposto visa aprimorar a perfusão em territórios com miocárdio viável e não recuperar áreas inativas. Assim atribuímos a melhora dos escores cintilográficos à diminuição da gravidade de isquemia em regiões tratadas. Pode ser entendido que a melhora evidenciada nas cintilografias de repouso nesta série de pacientes representa melhor perfusão miocárdica, mas ainda insuficiente para haver completa reperfusão, pois permanece a evidência de isquemia ao estresse, embora possa ser considerada menor que anteriormente. De qualquer modo, representa um inequívoco efeito

angiogênico da terapia gênica empregada sobre essas áreas de miocárdio.

Nosso estudo utilizou VEGF 165 plasmidial como única terapêutica. Outros relatos prévios utilizaram a mesma terapia, porém em associação a cirurgia de revascularização do miocárdio, entre outros [7-16,19-21]. Dois estudos prévios [17,18] semelhantes ao nosso nesse aspecto demonstraram resultados controversos, um demonstrando melhora de perfusão miocárdica e angina [17] e outro apenas melhora da angina [18]. Porém, tratavam-se também de séries pequenas de pacientes e utilizaram diferentes doses de VEGF 165.

Ensaio clínico randomizado recente testando terapia gênica associada à cirurgia de revascularização do miocárdio e ainda suplementação oral de L-arginina demonstrou resultados promissores na associação, inferindo que a disfunção endotelial poderia estar associada na fisiopatologia dessa classe de pacientes. Logo, a suplementação de L-arginina poderia induzir ao aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico, sendo favorável à angiogênese [19]. No entanto, há indícios de que a suplementação oral de L-arginina pode não ser segura no tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST [22]. Outro estudo recente [20], randomizado, multicêntrico, não demonstrou diferença significativa nos escores de isquemia miocárdica entre os grupos tratado e controle. Todavia, diferentemente do anterior e do nosso próprio estudo, este utilizou a técnica de mapeamento eletromecânico pelo sistema NOGA para injeção do vetor.

A avaliação da qualidade de vida desta série demonstrou melhora três meses após a aplicação da terapia gênica com VEGF 165, sendo que não havia ocorrido diferença da mesma variável enquanto os pacientes se mantiveram em tratamento medicamentoso máximo. Estudo prévio [15] demonstrou resultados semelhantes em uma série de 22 pacientes que receberam VEGF 165. Da mesma forma, as classes funcionais de insuficiência cardíaca (NYHA) e angina (CCS) apresentadas pelos pacientes três meses após a terapia com VEGF 165 foram significativamente reduzidas. Durante o período de tratamento clínico máximo, pode-se observar até mesmo piora da sintomatologia em alguns casos, o que pode ser interpretado como evolução natural da doença isquêmica em fase terminal, sem alternativa terapêutica. Ensaio clínico randomizado prévio [10] já havia demonstrado resultados semelhantes. Nesse, no início do seguimento todos os pacientes foram classificados nas classes III ou IV de angina e, ao fim de 12 semanas, a mesma variável demonstrou-se significativamente reduzida em pacientes que receberam phVEGF2. Em contraste, a classe de angina permaneceu inalterada no grupo controle.

Considera-se que a possível interferência do efeito placebo nessa série de pacientes possa alterar a percepção

dos mesmos quanto à sintomatologia da doença, tornando-se um fator de confusão dos resultados. Todavia, as melhoras cintilográficas demonstradas nas áreas miocárdicas isquêmicas, bem como a tendência a melhora nos METs obtidos pelos pacientes nos testes ergométricos podem ser indicativos de relevância nos resultados identificados nos escores de qualidade de vida e classes NYHA e CCS. Deve ser lembrado, ainda, que quando os mesmos escores foram aplicados antes e após o tratamento medicamentoso máximo, ao qual os pacientes foram submetidos, não se observaram diferenças significativas, vindo ao encontro da mesma hipótese.

CONCLUSÕES

A terapia gênica com VEGF 165 plasmidial demonstrou-se segura e viável nessa amostra de pacientes. Os resultados clínicos iniciais parecem demonstrar melhora da intensidade da isquemia nas áreas de miocárdio tratado três meses após o tratamento. Nesta série de pacientes, observou-se melhora da qualidade de vida, e das classes de angina e insuficiência cardíaca no mesmo período. Apesar deste estudo ter sido realizado em uma série pequena de pacientes, os resultados parciais parecem promissores, estimulando a pesquisa sobre essa nova modalidade de tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Kastrup J. Therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease: gene or recombinant vascular growth factor protein therapy? *Curr Gene Ther.* 2003;3(3):197-206.
2. Isner JM. Myocardial gene therapy. *Nature.* 2002;415(6868):234-9.
3. Lewis BS, Flugelman MY, Weisz A, Keren-Tal I, Schaper W. Angiogenesis by gene therapy: a new horizon for myocardial revascularization? *Cardiovasc Res.* 1997;35(3):490-7.
4. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001;49(3):507-21.
5. Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res.* 1989;1(4):207-35.
6. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13(1):9-22.
7. Kastrup J, Jørgensen E, Ruck A, Tägil K, Glogar D, Ruzyllo W, et al. Euroinject One Group. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris. A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(7):982-8.
8. Eppler SM, Combs DL, Henry TD, Lopez JJ, Ellis SG, Yi JH, et al. A target-mediated model to describe the pharmacokinetics and hemodynamic effects of recombinant human vascular endothelial growth factor in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72(1):20-32.
9. Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, et al. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation.* 2002;105(7):788-93.
10. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation.* 2002;105(17):2012-8.
11. Sylvén C, Sarkar N, Ruck A, Drvota V, Hassan SY, Lind B, et al. Myocardial Doppler tissue velocity improves following myocardial gene therapy with VEGF-A165 plasmid in patients with inoperable angina pectoris. *Coron Artery Dis.* 2001;12(3):239-43.
12. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation.* 1999;100(5):468-74.
13. Stewart DJ, Hilton JD, Arnold JM, Gregoire J, Rivard A, Archer SL, et al. Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF(121) (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Ther.* 2006;13(21):1503-11.
14. Bokeriya LA, Golukhova EZ, Eremeeva MV, Aslanidi IP, Merzlyakov VY, Georgiev GP, et al. Use of human VEGF(165) gene for therapeutic angiogenesis in coronary patients: first results. *Cell Tech Biol Med.* 2005;3:123-30.
15. Kolsut P, Malecki M, Zelazny P, Teresinska A, Firek B, Janik P, et al. Gene therapy of coronary artery disease with phvegf165: early outcome. *Kardiologia Pol.* 2003;59(11):373-84.
16. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Maysky M, Esakof DD, Symes JF, et al. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation.* 2000;102(9):965-74.

17. Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Mayskiy M, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg.* 1999;68(3):830-6.
18. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Mayskiy M, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation.* 1998;98(25):2800-4.
19. Ruel M, Beanlands RS, Lortie M, Chan V, Camack N, deKemp RA, et al. Concomitant treatment with oral L-arginine improves the efficacy of surgical angiogenesis in patients with severe diffuse coronary artery disease: the Endothelial Modulation in Angiogenic Therapy randomized controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;135(4):762-70.
20. Stewart DJ, Kutryk MJ, Fitchett D, Freeman M, Camack N, Su Y, et al; NORTHERN Trial Investigators. VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the NORTHERN trial. *Mol Ther.* 2009;17(6):1109-15.
21. Ripa RS, Wang Y, Jørgensen E, Johnsen HE, Hesse B, Kastrup J. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor-A165 plasmid followed by granulocyte-colony stimulating factor to induce angiogenesis in patients with severe chronic ischaemic heart disease. *Eur Heart J.* 2006;27(15):1785-92.
22. Schulman SP, Becker LC, Kass DA, Champion HC, Terrin ML, Forman S, et al. L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA.* 2006;295(1):58-64.
23. Kalil RA, Teixeira LA, Mastalir ET, Moreno P, Fricke CH, Nardi NB. Experimental model of gene transfection in healthy canine myocardium: perspectives of gene therapy for ischemic heart disease. *Arq Bras Cardiol.* 2002;79(3):223-32.
24. Furlani AP, Kalil RA, Castro I, Cañedo-Delgado A, Barra M, Prates PR, et al. Effects of therapeutic angiogenesis with plasmid VEGF165 on ventricular function in a canine model of chronic myocardial infarction. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2009;24(2):143-9.